

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DENTÍSTICA RESTAURADORA**

PAMELA MALAQUIAS

**AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE CLOREXIDINA EM SISTEMAS ADESIVOS
NA LIBERAÇÃO E SEUS EFEITOS NA LONGEVIDADE DA INTERFACE DE
UNIÃO À DENTINA**

**PONTA GROSSA
2016**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DENTÍSTICA RESTAURADORA**

PAMELA MALAQUIAS

**AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE CLOREXIDINA EM SISTEMAS ADESIVOS
NA LIBERAÇÃO E SEUS EFEITOS NA LONGEVIDADE DA INTERFACE DE
UNIÃO À DENTINA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Odontologia na Universidade Estadual de Ponta Grossa, área de concentração em Dentística Restauradora.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro D. Loguercio

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

PONTA GROSSA

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

M238 Malaquias, Pamela
Avaliação da incorporação de clorexidina em sistemas adesivos na liberação e seus efeitos na longevidade da interface de união à dentina/ Pamela Malaquias. Ponta Grossa, 2016.
48f.

Dissertação (Mestrado em Odontologia - Área de Concentração: Dentística Restauradora), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.

1.Clorexidina. 2.Adesivos dentinários. 3.Longevidade. I.Loguercio, Alessandro Dourado. II. Farago, Paulo Vitor. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Odontologia. IV. T.

CDD: 617.6

TERMO DE APROVAÇÃO

PAMELA MALAQUIAS

AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE CLOREXIDINA EM SISTEMAS ADESIVOS NA LIBERAÇÃO E SEUS EFEITOS NA LONGEVIDADE DA INTERFACE DE UNIÃO À DENTINA

Dissertação apresentada como pré-requisito para obtenção do título de Mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Mestrado em Odontologia – Área de Concentração em Dentística Restauradora.

Ponta Grossa, 23 de fevereiro de 2016.



Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio - Orientador
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Profª. Drª. Viviane Hass
Centro Universitário do Maranhão



Profª. Drª. Ana Claudia Rodrigues Chibinski
Universidade Estadual de Ponta Grossa

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Paulo e Letícia, por todo apoio, incentivo e
amor! Sem vocês nada disso seria
possível.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo simples fato de estar viva. A Ele toda honra e toda glória por tudo que sou e por tudo que tenho hoje. Pelos momentos mais difíceis onde sabia que não dependia mais de meus esforços, mas sim da provisão divina para operar o impossível aos olhos humanos. A Ele, pai amado, que tanto faz por mim mesmo eu não sendo merecedora. A Sua graça me basta.

Aos meus pais, **Paulo e Leticia**, por estarem sempre presentes, me apoiando e incentivando ao estudo. Por me mostrarem que o estudo pode mudar a vida de uma pessoa, e por me ensinarem valores incorruptíveis. Por me suportarem em casa nestes anos e pela paciência. Espero poder orgulhar vocês em tudo que faço.

Aos meus irmãos, **Tamirez e Conrado**. Obrigada por me aguentarem, por fazerem-me rir de coisas bobas, mas que foram em momentos oportunos quando estava precisando de descanso e conforto. Obrigada porque sei que posso encontrar em vocês a paz e o conforto familiar. Quem tem um irmão nunca está sozinho.

Ao meu noivo **Victor**, por todo amor, apoio, incentivo e consolo. Por estar presente em todos os momentos, por se orgulhar de mim, por me ouvir e por nunca desistir de mim. Obrigada por ser, além de noivo, o meu melhor amigo.

Às minhas amigas **Carolina, Cinthia, Kaprice e Thais**. Amigas para todas as horas, com quem pude compartilhar momentos de alegria e descontração, mas também momentos de estresses e preocupações. Agradeço pela amizade, pela companhia e pela paciência. Contem comigo sempre.

Ao meu grande amigo que o mestrado me presenteou, **Felipe**, por todo apoio em todos os momentos, por toda ajuda e ensinamento que me proporcionou. A melhor dupla que Deus poderia ter me dado. Além de um grande profissional, um grande amigo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Alessandro**, que me orienta desde a iniciação científica, na graduação. Quem me ajudou a dar os primeiros passos no mundo científico e está sempre a disposição e sempre pensando no melhor para seus alunos. Obrigada por todo ensinamento, paciência e colaboração no meu desenvolvimento como profissional. É, e sempre será, a pessoa em quem me espelho e sonho em ser, pelo menos um pouco do que és no meu futuro profissional.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. **Paulo Vitor**, que também me acompanha desde a iniciação científica. Obrigada pela paciência, por todo conhecimento compartilhado e pela dedicação e empenho nas suas funções. Pelos momentos reservados e dedicados apenas para sentar e me explicar com detalhes e paciência, que fazem toda a diferença no desenvolvimento de um bom trabalho.

À Prof.^a **Denise** por todo o carinho e atenção dedicada a mim e a todos os alunos da pós. Agradeço por toda dedicação e trabalho em função de tornar o PPGO um lugar melhor e acessível a todos os alunos.

A todos os **funcionários** da UEPG e do PPGO que colaboram e dedicam seu tempo para suprir nossas necessidades, sejam elas de materiais, consertos e limpeza dos nossos locais de trabalho. Vocês são essenciais para o desenvolvimento de nossas pesquisas.

A todos os **professores** da UEPG e do PPGO que de alguma forma, direta ou indiretamente, colaboraram com meu trabalho e colaboram também para que haja um bom funcionamento da universidade e do programa.

Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima.

(Louis Pasteur)

DADOS CURRICULARES

Pamela Malaquias

NASCIMENTO	25 DE ABRIL DE 1991 PONTA GROSSA - PARANÁ.
FILIAÇÃO	PAULO MALAQUIAS FILHO LETICIA SIMONETTI MALAQUIAS
2009 - 2013	CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA - UEPG
2013 - 2014	APERFEIÇOAMENTO EM IMPLANTODONTIA E PRÓTESE DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ODONTOLOGIA DE PONTA GROSSA - ABOPG
2014 - 2015	MESTRADO EM DENTISTICA RESTAURADORA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA – PPGO-UEPG

MALAQUIAS P. Avaliação da incorporação de clorexidina em sistemas adesivos na liberação e seus efeitos na longevidade da interface de união à dentina. [Dissertação de Mestrado em Odontologia-Dentística Restauradora]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa UEPG; 2016.

Resumo

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da adição de diacetato de clorexidina (CHX), em dois diferentes sistemas adesivos simplificados na resistência de união (RU), nanoinfiltração (NI) e liberação de clorexidina (LCHX). A CHX foi adicionada aos sistemas adesivos XP Bond [XP] (Dentsply) e Ambar [AM] (FGM) nas concentrações: 0% (controle); 0,01%; 0,05%; 0,1% e 0,2% em peso. Para RU e NI, foram utilizados 50 terceiros molares extraídos que tiveram uma superfície plana de dentina exposta, e foram divididos aleatoriamente de acordo com os diferentes grupos experimentais anteriormente citados. Seguiu-se a sequência clínica indicada pelo fabricante de cada sistema adesivo. Após a aplicação do adesivo, foram confeccionadas restaurações de resina composta pela técnica incremental. Em seguida, os espécimes foram preparados e submetidos a testes de microtração e nanoinfiltração em 24 horas e 2 anos de armazenamento em água a 37°C. Para avaliação da liberação cumulativa de CHX, discos de adesivos (n = 10 para cada grupo) foram preparados em uma matriz metálica (5,8 mm x 1,0 mm) e armazenados em água destilada. Mensurações espectrofotométricas da solução de armazenamento foram realizadas para examinar a cinética da liberação de CHX. Para liberação de CHX (% e mg/g), os dados de cada adesivo foram submetidos a um ANOVA de duas vias. Os dados de RU (MPa) e NI (%) de cada adesivo foram submetidos à análise de variância de dois fatores (ANOVA). O teste de Tukey foi utilizado para comparações de pares ($\alpha = 0,05$). Na RU, Ambar apresentou valores melhores na porcentagem de redução da resistência de união após 2 anos de armazenamento em água. Ambos os adesivos apresentaram melhores valores de resistência de união nos grupos contendo CHX, quando comparados ao grupo controle (sem CHX). Na NI, os grupos controle apresentaram uma maior nanoinfiltração no período 2 anos. XP apresentou maior nanoinfiltração que Ambar em todos os grupos. Quanto à LCHX, Ambar apresentou uma liberação mais lenta e gradativa enquanto que XP Bond liberou CHX mais rapidamente. Concluiu-se que a adição de diacetato de CHX até 0,2% é um método viável para proporcionar um aumento em longo prazo da estabilidade das interfaces resina-dentina, sem comprometer as propriedades dos sistemas adesivos.

Palavras chave: Clorexidina; Sistemas Adesivos; Longevidade.

MALAQUIAS P. Evaluation of chlorhexidine incorporation in adhesive systems in the release and their effects on longevity of resin-dentin interface. [Master Thesis in Dentistry-Restorative Dentistry]. Ponta Grossa: State University of Ponta Grossa UEPG; 2016.

Abstract

The aim of the study was to evaluate the effects of adding chlorhexidine diacetate (CHX), in two different simplified adhesive systems on the chlorhexidine release (CHXR), bond strength (μ TBS) and nanoleakage (NL). The CHX was added to adhesive systems XP Bond [XP] (Dentsply, York, PA, USA) and Ambar [AM] (Prod Odont Ltda FGM, Joinville, Brazil) at concentrations of 0 (control); 0.01; 0.05; 0.1 to 0.2% wt. To assess the cumulative CHXR, adhesives disks (n = 10 for each group) were prepared in a metallic matrix (5.8 mm x 1.0 mm) and stored in distilled water. Spectrophotometric measurements of the storage solution were performed to examine the kinetics of release of CHX. For μ TBS and NL 50 extracted third molars were used and they had a flat surface of dentin exposed, and were randomly divided according to the different experimental groups mentioned above. This was followed by clinical sequence specified by the manufacturer of each adhesive system. After applying the adhesive, resin composite restorations was built in layers. Then, the specimens were prepared and subjected to microtensile and nanoleakage testing at 24 and 24 months of storage in water at 37°C. For CHXR (% and mg/g), the data of each adhesive were subjected to a two-way ANOVA. The μ TBS data (MPa) and NL (%) of each adhesive were submitted to analysis of variance of two factors (ANOVA). The Tukey test was used for pairwise comparisons ($\alpha = 0.05$). Regarding CHXR, Ambar showed a slower and gradual release of CHX while XP Bond released CHX more quickly. In μ TBS, Ambar showed better values in percentage of bond strength reduction after 2 years of storage in water. Both adhesives showed better bond strength values in groups containing CHX compared to the control group (without CHX). In NL, the control group had a higher nanoleakage in 2 years. XP had a higher nanoleakage that Ambar in all groups. We concluded that the addition of CHX diacetate until 0.2% is a viable method of providing a long-term increase in the stability of resin-dentin interfaces without compromising the properties of the adhesives systems.

Keywords: Chlorhexidine; Adhesives systems; Longevity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Espectrofotômetro ultra-violeta (UV) visível.....	23
Figura 2 –	Confecção dos espécimes de adesivo para análise da liberação de clorexidina.....	23
Figura 3 –	Curva analítica de regressão linear da clorexidina.....	24
Figura 4 –	Preparo da superfície dental para o teste de microtração.....	25
Figura 5 –	Protocolo de aplicação do sistema adesivo. Todos os procedimentos realizados segundo as indicações do fabricante, os quais estão discriminados na Tabela 1.....	26
Figura 6 –	Protocolo da confecção de restaurações de resina composta pela técnica incremental.....	26
Figura 7 –	Sequência de corte do dente para a obtenção dos espécimes.....	27
Figura 8 –	Sequência de execução para o teste de microtração.....	28
Figura 9 –	Classificação dos modos de fratura após a realização do teste de microtração.....	28
Figura 10 –	Preparo das amostras para realização da análise de nanoinfiltração.....	30
Figura 11 –	Imagens de MEV das interfaces adesivas.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sistema adesivo utilizado, composição e modo de aplicação.....	21
Tabela 2 – Modelos matemáticos relacionados aos experimentos de liberação de CHX.....	24
Tabela 3 – Liberação de CHX em % e mg/g de todos os grupos experimentais.....	32
Tabela 4 – Número de espécimes (%) de acordo com o padrão de fratura e falhas prematuras para cada grupo experimental.....	33
Tabela 5 – Médias e desvios padrão de resistência de união (MPa) obtidos em cada condição experimental.....	33
Tabela 6 – Médias e desvios padrão de nanoinfiltração (%) para todos os grupos experimentais.....	34

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Fratura adesiva
A/M	Fratura adesiva/mista
AM	Adesivo Ambar
C	Fraturas coesivas
CHX	Clorexidina
cm	Centímetros
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EGCG	Epigallocatequina-3-galato
LED	Diodo emissor de luz, pela frase em inglês Light Emitting Diode
MDP	Brometo meta-criloxidecil dihidrogenosfosfato
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MMPs	Metaloproteinases de matriz
mW	Miliwatts
Nº ou n	Número
NI	Nanoinfiltração
nm	Nanômetros
pH	Potencial hidrogeniônico
RU	Resistência de União
SiC	Carbeto de silício
UV	Ultravioleta
XP	Adesivo XP Bond

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	14
2	PROPOSIÇÃO	20
2.1	PROPOSIÇÃO GERAL	20
2.2	PROPOSIÇÃO ESPECÍFICA	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	FORMULAÇÃO DOS ADESIVOS EXPERIMENTAIS	21
3.2	LIBERAÇÃO DE CLOREXIDINA (LCHX)	22
3.3	RESISTÊNCIA DE UNIÃO (RU)	24
3.4	NANOINFILTRAÇÃO (NI)	29
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
4	RESULTADOS	32
4.1	LIBERAÇÃO DE CLOREXIDINA (LCHX)	32
4.2	RESISTÊNCIA DE UNIÃO (RU)	33
4.3	NANOINFILTRAÇÃO (NI)	34
5	DISCUSSÃO	36
6	CONCLUSÃO	40
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Nos últimos anos a Odontologia Restauradora sofreu uma grande evolução em suas técnicas e materiais, viabilizando procedimentos cada vez mais estéticos e conservadores. A Odontologia Adesiva ocupa posição de destaque neste contexto, se solidificando como um dos principais tópicos de investigação científica desta área.

Os sistemas atuais são constituídos de três etapas básicas: condicionamento ácido, *primer* e adesivo (*bond*). De forma sucinta, pode-se dizer que o ácido faz uma desmineralização que aumenta a porosidade do substrato; os poros são preenchidos pelo *primer* que é subsequentemente coberto pelo agente hidrofóbico (*bond*) para garantir a união com o material resinoso restaurador (Van Meerbeek et al.¹ 2003; Carvalho et al.² 2004; Breschi et al.³ 2007; Pashley et al.⁴ 2007).

Logo após sua aplicação, os materiais resinosos demonstram uma união satisfatória à dentina. Contudo, estes materiais se tornam mais suscetíveis à degradação ao longo do tempo (Carvalho et al.⁵ 1998). A efetividade dos procedimentos restauradores adesivos tem sido questionada com relação à durabilidade da união ao substrato dentinário.

A durabilidade de união entre sistemas adesivos e substratos dentais é de grande importância para a longevidade clínica das restaurações adesivas (Peumans et al.⁶ 2005; Breschi et al.³ 2007). Estudos que avaliaram a resistência da interface demonstraram drástica redução da resistência de união, sendo esta frequentemente acompanhada por alterações morfológicas que revelam a desnaturação parcial ou completa de seus constituintes, isto é, dos monômeros resinosos que compõe os sistemas adesivos e da dentina modificada pelo procedimento adesivo (Hashimoto et al.^{8;9} 2000; 2001; Hebling et al.¹⁰ 2005; Donmez et al.¹¹ 2005; Carrilho et al.⁷ 2007). Desta maneira, pode-se indicar que a diminuição da união ao longo do tempo ocorre devido a diferentes fatores: hidrólise dos componentes resinosos (Sano et al.¹² 1999; Carrilho et al.¹³ 2005), da dentina desmineralizada e desprotegida pela deficiente infiltração de monômeros resinosos (Hashimoto et al.^{8; 9} 2000, 2001; De Munck et al.¹⁴ 2003) e digestão enzimática dos constituintes da interface, incluindo o colágeno desnaturado, por metaloproteases (Chaussain-Miller et al.¹⁵ 2006; Hannas et al.¹⁶ 2007).

A deterioração da interface dentina-resina resulta da degradação hidrolítica, que pode ocorrer mesmo na ausência de fendas na interface. A presença de

espaços internos na camada híbrida ou nas camadas do adesivo (Sano¹⁷ 2006) é explicada pelo fenômeno da nanoinfiltração, descrito pela primeira vez por Sano e colaboradores (Sano et al.¹⁸ 1995; Sano et al.¹⁹ 1995). A degradação hidrolítica ocorre na presença desses espaços, que são preenchidos por água e que favorecem a movimentação de fluido na interface dentina-resina (Wang e Spencer²⁰ 2002). Esta sorção de água inicialmente tem efeito plastificador e altera parcialmente a energia de coesão das cadeias poliméricas (Ferracane²¹ 2006). A água, contudo, não atua apenas como agente plastificador visto que, com o passar do tempo, pode provocar hidrólise de suas moléculas e degradação estrutural, ou seja, hidrólise dos constituintes da interface, principalmente dos monômeros adesivos (Santerre²² et al., 2001; Ferracane²¹ 2006).

Aliado a isto, o colágeno da dentina, quando desprotegido, também pode ser hidrolisado com o tempo (Tay et al.²³ 2002; Sano¹⁷ 2006; Van Meerbeek²⁴ 2007). A matriz orgânica dentinária é constituída principalmente por fibrilas colágenas, e na superfície de suas fibrilas estão distribuídas proteínas não colagenosas, tais como fosforina, sialoproteína dentinária e glicosaminoglicanas. Essas proteínas interagem com o colágeno a partir de ligações que estabelecem com moléculas de água fortemente adsorvidas ao colágeno, formando uma rede de polímeros hidrofílicos. Essa rede polimérica pode absorver água, porém se apresenta insolúvel devido à presença de ligações peptídicas (Nakabayashi e Saimi²⁵ 1996).

Estudos indicam que na presença de ácidos produzidos por bactérias, ou quando é realizado o condicionamento ácido do substrato, parte do conteúdo mineral é dissolvido expondo as fibrilas de colágeno e demais proteínas. Dessa forma, ocorre a desnaturação parcial das fibrilas de colágeno (Tjäderhane et al.²⁶ 1998). Em seguida, acontece a ação proteolítica dos componentes da própria matriz de dentina desmineralizada ou da dentina adjacente à camada híbrida através, por exemplo, da proteólise do colágeno, devido à reativação das metaloproteinases da matriz (MMPs), enzimas não colagênicas que constituem parte da matriz extracelular da dentina (Pashley et al.²⁷ 2004; Hebling et al.¹⁰ 2005; Chaussain-Mille et al.¹⁵ 2006; Brackett et al.²⁸ 2007; Carrilho et al.⁷ 2007; Carrilho et al.²⁹ 2007; Zhang e Kern³⁰ 2009; Moon et al.³¹ 2010).

Estudos demonstraram que os sistemas adesivos (tanto os de condicionamento ácido total, como os autocondicionantes) não conseguem recobrir totalmente as fibrilas colágenas expostas após o processo de desmineralização

(Wang e Spencer³² 2003; Wang e Spencer³³ 2004; Carvalho et al.² 2004). Isto resulta em fibrilas colágenas desprotegidas e vulneráveis no interior da camada híbrida, o que as tornam susceptíveis ao processo de degradação proteolítica pelas MMPs (Pashley et al.²⁷ 2004; Mazzoni et al.³⁴ 2006; Brackett et al.²⁸ 2007; Carrilho et al.⁷ 2007; Brackett et al.³⁵ 2009; Zhang e Kern³⁰ 2009; Moon et al.³¹ 2010).

As MMPs constituem um grupo de mais de vinte enzimas conhecidas como endopeptidases presentes na matriz extracelular, e que separadamente ou em conjunto quebram muitos, senão todos, os constituintes desta matriz (Birkedal-Hansen et al.³⁶ 1993; Clark et al.³⁷ 2008), em especial quando se observa intensa atividade metabólica de remodelação e degradação de vários tipos de colágeno. Revisões específicas na área odontológica sobre MMPs têm sido amplamente discutidas e publicadas (Sorsa et al.³⁹ 2006; Hannas et al.¹⁶ 2007; Perdigão et al.³⁸ 2016).

Durante os procedimentos de união das resinas compostas aos tecidos dentais, a dentina é condicionada por monômeros ácidos tendo parte de sua estrutura mineral removida. Neste momento, tanto o colágeno como também proteínas não-colagênicas podem ser expostas. Sabe-se que os sistemas de união disponíveis, invariavelmente, falham nesta infiltração (Hashimoto et al.^{9; 40} 2001, 2003; Wang e Spencer^{20; 32} 2002, 2003; Carvalho et al.⁴¹ 2005), portanto inúmeros sítios da matriz dentinária poderão permanecer expostos. Desta maneira, há suspeitas de que as MMPs expostas possam de alguma forma participar da degradação do colágeno exposto durante o procedimento adesivo, mesmo na ausência de bactérias, através de um mecanismo proteolítico endógeno. Estas hipóteses têm sido confirmadas por estudos laboratoriais e clínicos ex-vivo (Hashimoto et al.⁴⁰ 2003; Pashley et al.²⁷ 2004; Hebling et al.¹⁰ 2005; Armstrong et al.⁴² 2006; Mazzoni et al.³⁴ 2006; Nishitani et al.⁴³ 2006; Carrilho et al.⁷ 2007).

Alternativas têm sido propostas para a melhoria da adesão dos materiais dentários ao dente, como por exemplo, a utilização de agentes que apresentam grande atividade antimicrobiana e inibitória de MMPs. Estudos demonstraram este potencial antimicrobiano e/ou inibidor de MMPs em compostos como a epigallocatequina-3-galato [EGCG] (Du et al.⁴⁴ 2012; Yun et al.⁴⁵ 2004), galardina (Breschi et al.⁴⁶ 2010), tetraciclina (Stanislawczuk et al.⁴⁷ 2011), cloreto de benzalcônio (Sabatini et al.⁴⁸ 2014), sais de quaternário de amônio, como o brometo

meta-criloxidecil diidrogenosfosfato (MDPB) (Donmez et al.⁴⁹ 2005; Tezvergil-Mutluay et al.⁵⁰ 2011) e ácido etileno diamino tetracético (EDTA) (Jacques e Hebling⁵¹ 2005; Sauro et al.⁵² 2009), auxiliando, portanto, na preservação da camada híbrida.

O composto mais comumente estudado é a clorexidina (CHX), que é um agente antimicrobiano e é um dos mais importantes inibidores de proteases (Pashley et al.⁵³ 2004). A clorexidina é um antiséptico catiônico que age contra uma ampla variedade de bactérias, fungos e também vírus (Denton et al.⁵⁴ 1991). Em altas concentrações, a atividade de enzimas associada à membrana, como dehidrogenases e ATPase, é indiretamente afetada (Davies⁵⁵ 1973; Brex e Theilade⁵⁶ 1984). Esse fármaco causa diferentes efeitos dependendo da sua concentração: bacteriostático em baixas concentrações e bactericida em altas concentrações. A atividade bacteriostática e bactericida da clorexidina é reduzida na presença de altas concentrações de soro, proteína, sangue e outros compostos orgânicos (Boobis⁵⁷ 1991).

Suas aplicações são inúmeras, tanto na área médica quanto odontológica, como por exemplo, a clorexidina a uma concentração de 4%, é utilizada para a desinfecção pré-operatória das mãos e por não apresentar absorção cutânea pode ser usada diariamente (Boobis⁵⁷ 1991). Outra possibilidade é a imersão por 30 minutos em solução de clorexidina (0,05%), utilizada para a desinfecção de instrumentais limpos. Também é utilizada para combater o aumento da placa bacteriana e alterações da microbiota gerada pela dificuldade de higienização devido à presença do aparelho ortodôntico (Zanatto⁵⁸ 1996) e em pacientes com alto risco à cárie (Brauner⁵⁹ 1982; Navarro e Côrtes⁶⁰ 1995). O uso da clorexidina sob a forma de dentifrícios tem atividade reduzida, uma vez que há competição ou inativação pelos sítios de retenção entre íons cálcio e os detergentes aniônicos presentes em suas formulações (Denardi⁶¹ 1994), mas esta também é outra aplicação deste composto.

Uma alternativa amplamente utilizada na Odontologia Restauradora é a inclusão de clorexidina em materiais restauradores, como por exemplo, cimentos ionoméricos, sistemas adesivos e condicionadores ácidos (Palmer et al.⁶² 2004; Leung et al.⁶³ 2005; Zhou et al.⁶⁶ 2009; De Munck et al.⁶⁷ 2009; Stanislawczuk et al.⁶⁸ 2009; Stanislawczuk et al.⁶⁹ 2011; Stanislawczuk et al.⁶⁴ 2014; Stanislawczuk et

al.⁶⁵ 2014), como tentativa de melhorar as propriedades antibacterianas destes materiais através da doação de clorexidina ao longo do tempo. A inclusão em materiais é também uma alternativa prática e ágil, visto que não será um passo clínico adicional.

Em cimentos ionoméricos, a CHX liberada das amostras, em estudo *in vitro*, foi mais eficaz na prevenção da formação de biofilme superficial do que cimentos comerciais liberadores de flúor (Leung et al.⁶³ 2005). Apenas uma proporção relativamente baixa de CHX incorporada é liberada. A porcentagem liberada é, em grande parte, independente da quantidade de CHX contida no cimento e o período de tempo durante o qual a liberação ocorre também está relacionado com a quantidade de CHX. A sua incorporação em cimentos ionoméricos também resulta num aumento do tempo de trabalho e uma diminuição da resistência à compressão (Palmer et al.⁶² 2004).

Stanislawczuk et al.⁶⁸ 2009 concluíram que tanto o uso da CHX sendo aplicada como solução aquosa na cavidade quanto a inclusão desta em um condicionador ácido preservaram a interface de união à dentina, sem alterar as propriedades do sistema adesivo. E a inclusão da CHX em um condicionador ácido apresenta a vantagem de não haver a necessidade de passos adicionais no protocolo adesivo.

Esta é também uma vantagem para os adesivos com CHX adicionada em sua composição. O diacetato de CHX incluso no adesivo apresenta grande estabilidade em longo prazo da interface de união e proporciona uma liberação de CHX controlada ao longo do tempo, sem comprometer as propriedades mecânicas dos adesivos (Stanislawczuk et al.^{64; 65} 2014). Alguns estudos têm incorporado digluconato de CHX (Zhou et al.^{66; 70} 2009 e 2011), outros têm adicionado diacetato de CHX (De Munck et al.^{67; 71} 2009 e 2010). A principal diferença entre estes dois produtos químicos é que o digluconato só está disponível como uma solução aquosa, enquanto o diacetato está disponível como um pó. A adição de digluconato de CHX em um adesivo também significa a adição de água à formulação, que pode prejudicar o desempenho do adesivo devido ao aprisionamento de água (Paul et al.⁷² 1999).

A avaliação do efeito da adição de CHX na sorção de água e solubilidade de sistemas adesivos experimentais com diferentes graus de hidrofília demonstrou que, a concentração de CHX foi maior em adesivos mais hidrófilos, sendo esta

correlacionada com a sorção de água da película adesiva (Hiraishi et al.⁷³ 2008). A adição de diacetato de CHX em concentrações até 0,2% nos sistemas adesivos simplificados pode ser uma alternativa para aumentar a estabilidade em longo prazo das interfaces de união da restauração, sem comprometer as propriedades mecânicas dos adesivos avaliados, contudo apenas avaliações de até 1 ano foram recentemente publicadas na literatura (Stanislawczuk et al.⁶⁴ 2014).

Frente a isso, o presente estudo optou pelo uso do diacetato de CHX para o desenvolvimento dos sistemas adesivos experimentais e a sua avaliação em maior longo prazo.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 PROPOSIÇÃO GERAL

Avaliar *in vitro* a inclusão de diacetato de clorexidina em diferentes concentrações dentro de dois diferentes sistemas adesivos convencionais como forma de melhorar a longevidade da adesão à dentina.

2.2 PROPOSIÇÃO ESPECÍFICA

Avaliar a liberação de clorexidina ao longo do tempo a partir de corpos de prova confeccionados com os sistemas adesivos contendo diferentes concentrações de clorexidina.

Avaliar a resistência da interface de união dentina-resina imediata e após 2 anos de armazenamento em água de adesivos contendo diferentes concentrações de diacetato de clorexidina.

Avaliar nanoinfiltração imediata e após 2 anos de armazenamento em água de adesivos contendo diferentes concentrações de clorexidina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 FORMULAÇÃO DOS ADESIVOS EXPERIMENTAIS

Foram selecionados dois sistemas adesivos convencionais simplificados que preconizam a técnica do condicionamento ácido prévio, sendo eles: XP Bond [XP] (Dentsply, York, PA, EUA), com solvente à base de álcool tert-butanol, e Ambar [AM] (FGM Prod. Odont. Ltda, Joinville, SC, Brasil), com solvente à base de água e etanol. A Tabela 1 apresenta a composição detalhada e o modo de aplicação de cada sistema. Foram adicionadas cinco concentrações diferentes de diacetato de CHX aos adesivos (99,9% puro, SigmaChemical, St. Louis, MO, EUA) (% em peso): 0% (controle), 0,01%, 0,05%, 0,1% e 0,2% . A CHX foi adicionada ao adesivo e misturada mecanicamente por um misturador motorizado (com agitação).

Tabela 1 – Sistema adesivo, composição e modo de aplicação.

Sistema Adesivo	Composição (*)	Modo de aplicação		
		Condicionamento ácido	Lavagem e secagem	Aplicação do adesivo
XP Bond (Dentsply)	Resina-TCB, álcool butílico, PENTA, PPD, UDMA, TEGDMA, HEMA, ácido carboxílico modificado e dimetacrilato	Ácido fosfórico 37% (Condac, FGM, Joinville, SC, Brasil) em dentina por 15 s.	Lavar por 30 s. Secar com papel absorvente. Manter dentina úmida.	Aplicação ativa por 20 s. Jato de ar por 5 s para evaporação do solvente. Fotoativação por 20 s (600 mW/cm ²)
Ambar (FGM)	Monômeros metacrilato (UDMA e MDP), fotoiniciadores, co-iniciadores, estabilizadores, nanopartículas de sílica inertes e etanol			Duas camadas de adesivo, ativamente, por 20 s (10 s cada). Jato de ar por 10 s para evaporação do solvente. Fotoativação por 10 s (600 mW/cm ²)

(*) Resina- TCB: butano-1,2,3,4- ácido tetracarboxílico éster di-2-hidroxietilmetacrilato; PENTA: dipentaeritritol pentacrilato monofosfato; PPD: fenilpropanodiona; UDMA: dimetacrilato de uretano ou 1,6-di (methacrilóiloxietilcarbamoil) -3,30,5-trimetilhexano; TEGDMA: dimetacrilato de trietilenoglicol; HEMA: metacrilato de 2-hidroxietil; 10-MDP: 10-metacrilóiloxidecil dihidrogenofosfato.

3.2 LIBERAÇÃO DE CLOREXIDINA (LCHX)

Foi utilizada uma série de soluções padrão contendo 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 µg/mL de diacetato de clorexidina para obtenção da curva analítica com uma regressão linear entre os valores de absorção e concentrações de CHX, utilizando o espectrofotômetro ultra-violeta (UV) visível (Genesys 10S UV-Vis - Thermo Scientific, Madison, WI, EUA) [Figura 1]. Foi confirmada a absorção máxima de CHX em 260 nm. Dez espécimes de cada grupo foram produzidos com uma matriz metálica circular (5,8 mm x 1,0 mm) e armazenados individualmente em água destilada (Figura 2). Em intervalos de tempo pré-definidos (1, 3 e 12 h; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 14, 21 e 28 dias e 24 meses), obteve-se os valores de absorção destas soluções de armazenamento a 260 nm e converteu-os para quantidades de CHX liberada, com base na curva analítica linear (Figura 3). Assim, foi subtraído o valor de absorção de UV a 260 nm dos grupos controles (0% CHX) a partir dos valores produzidos nos espécimes contendo CHX, considerando a liberação de monômero concomitante. A liberação cumulativa foi representada, para todos os períodos de tempo já citados, como porcentagem de CHX liberada e como massa (mg) de liberação de CHX por grama da amostra de adesivo.

O software MicroMath Scientist TM2.01 (Salt Lake City, UT, EUA) usou modelos matemáticos para construir perfis cumulativos de CHX liberada a partir dos espécimes de adesivo e avaliar o comportamento da liberação de CHX. Foram testados dados em primeira ordem, biexponencial, de ordem zero, Weibull e equações monolag (Tabela 2). Foi escolhido o melhor ajuste considerando o coeficiente de correlação (r), os critérios de seleção do modelo (CSM), e ajuste gráfico. Para obter algum esclarecimento sobre o mecanismo de liberação de CHX, também se utilizou uma equação muito simples e semi-empírica para descrever a liberação do fármaco a partir de sistemas poliméricos, a lei de potência (modelo Korsmeyer-Peppas): $ft = a \cdot tn$. Nesta equação, ft é a fração de CHX dissolvida no tempo t , n é o expoente de liberação, indicativo do mecanismo de liberação da substância e a é a constante que incorpora características estruturais e geométricas do espécime. Após a identificação do modelo que melhor descreve a liberação de clorexidina dos sistemas adesivos, calculou-se o tempo necessário para permitir uma liberação de 50% de CHX de cada material, assumindo esta equação manteve-

se dominante como mecanismo de liberação ao longo do tempo, utilizando software MathWorks Matlab TMR2012a (Natick, MA, EUA).



Figura 1- Espectrofotômetro ultra-violeta (UV) visível (Genesys 10S UV-Vis - Thermo Scientific, Madison, WI, EUA)

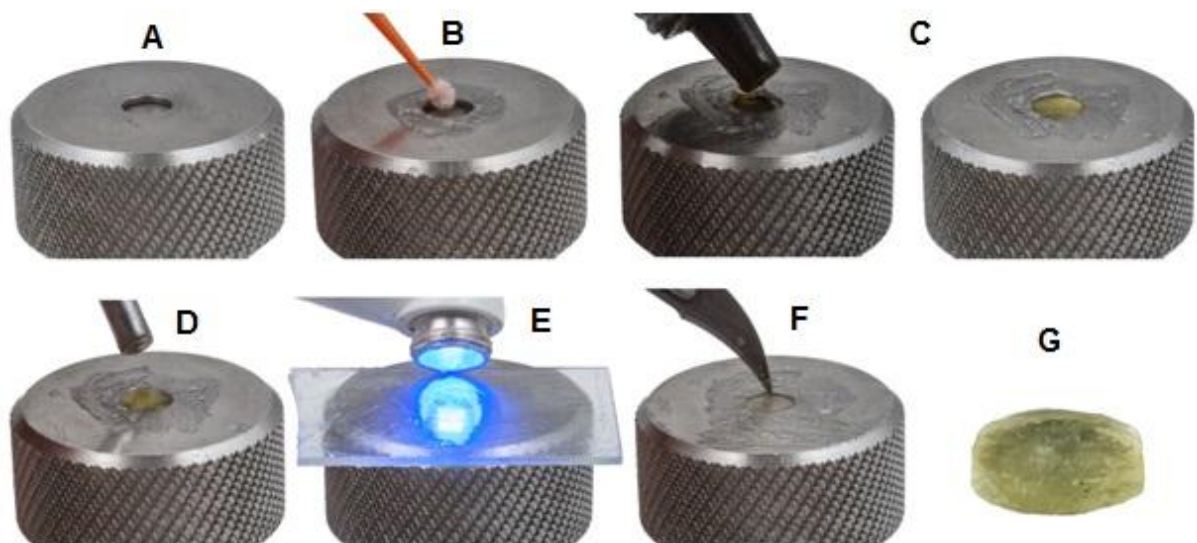


Figura 2- Confeção dos espécimes de adesivo. (A) matriz metálica circular; (B) aplicação de vaselina na matriz; (C) colocação do sistema adesivo na matriz; (D) jato de ar para evaporação do solvente; (E) fotoativação do adesivo; (F) remoção do espécime com lâmina de bisturi; (G) espécime de adesivo finalizado.

Tabela 2 – Modelos matemáticos relacionados aos experimentos de liberação de CHX.

Modelo	Equação
Monoexponencial	$%D = 100(1 - e^{-kt})$
Biexponencial	$%D = 100[1 - (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t})]$
Ordem zero	$%D = kt$
Weibull	$%D = 100[1 - e^{-(t/TD)^b}]$
Monolag	$%D = 100[1 - e^{-k(t-x)}]$

Onde: %D, o porcentual do fármaco dissolvido no tempo; t, k, α e β , as constantes cinéticas de dissolução verificadas; A e B, as concentrações iniciais do fármaco que contribuem para as duas fases de dissolução; TD, o tempo no qual 63,2 % do fármaco é dissolvido; b, o parâmetro relacionado às características estruturais e geométricas da forma farmacêutica.

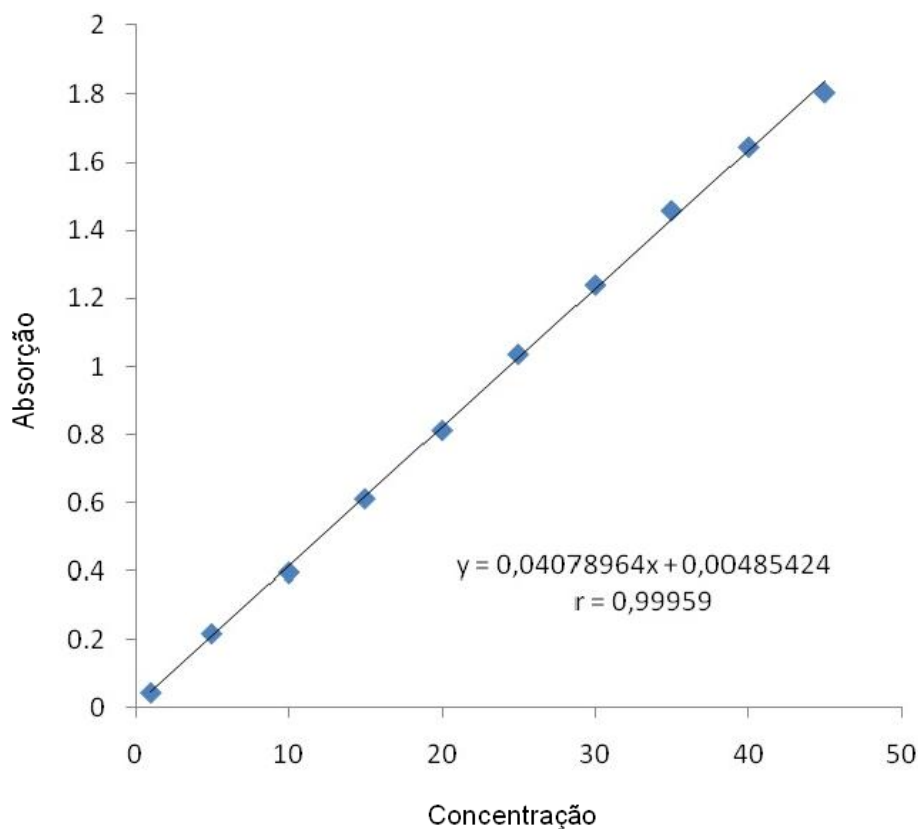


Figura 3- Curva analítica de regressão linear da clorexidina.

3.3 RESISTÊNCIA DE UNIÃO (RU)

Cinquenta terceiros molares humanos extraídos, livres de cárie, foram utilizados neste estudo. Os dentes foram coletados após a obtenção do consentimento informado dos pacientes, em um protocolo de número 1693/09, aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Paraná, Brasil). Os dentes foram desinfetados em cloramina 0,5% e armazenados em água destilada. Uma superfície plana de dentina foi exposta após a retirada do esmalte oclusal com lixa de carbeto de silício (SiC) granulação 180 e ponta diamantada 4137 (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) em alta rotação e irrigação constante, deixando unicamente tecido dentinário na região coronária (Figura 4). As superfícies de dentina expostas foram polidas em lixas de SiC granulação 600, por 60 s para uniformizar a *smear layer*. Cada superfície dentinária foi condicionada com um ácido fosfórico a 37%, durante 15 s. Após lavagem com água durante 30 s, e remoção do excesso de água, o sistema adesivo de cada grupo foi aplicado, de acordo com as recomendações do fabricante (Tabela 1), em uma superfície úmida de dentina e fotoativados utilizando um fotopolimerizador LED [1200 mW/cm²] (Radical, SDI, Bayswater, Victoria, Austrália) [Figura 5]. Restaurações foram confeccionadas com resina composta (Opallis, FGM Prod. Odont. Ltda, Joinville, SC, Brasil) em 3 incrementos de aproximadamente 1 mm cada, que foram individualmente fotoativados por 40 s usando a mesma unidade de fotoativação (Figura 6).

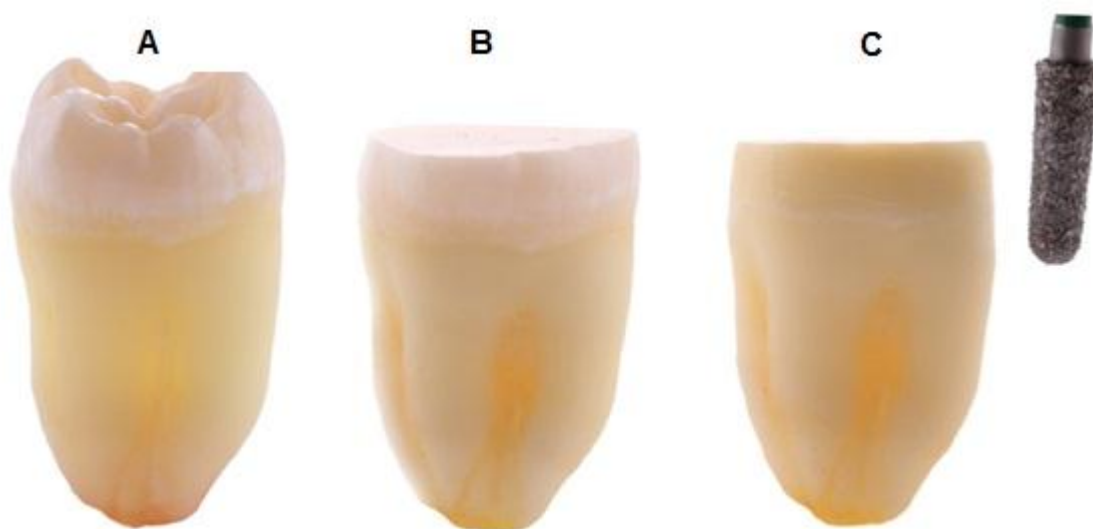


Figura 4- Preparo dos dentes. (A) dente hígido; (B) remoção do esmalte oclusal; (C) remoção do esmalte dentário restante.

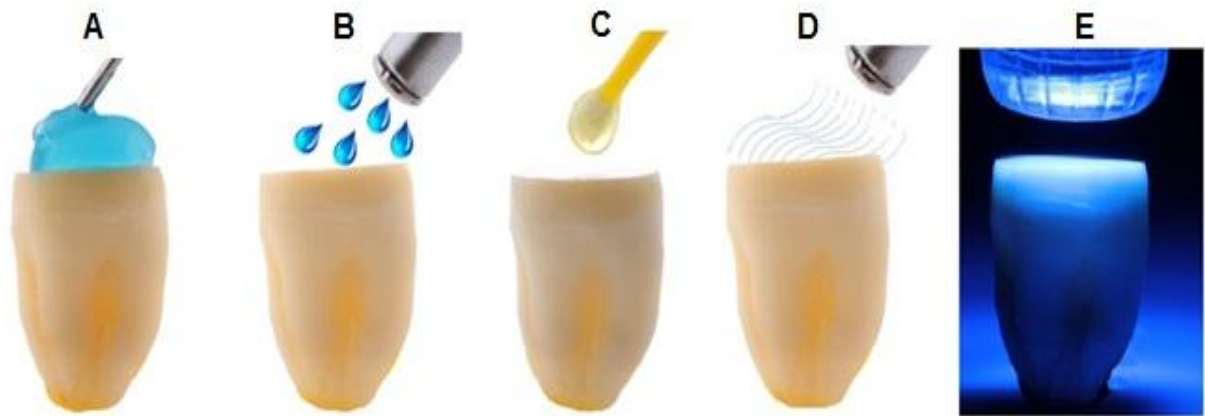


Figura 5- Protocolo adesivo. (A) condicionamento ácido da superfície de dentina; (B) lavagem para remoção do ácido; (C) aplicação do sistema adesivo; (D) jato de ar para evaporação do solvente; (E) fotoativação do sistema adesivo.

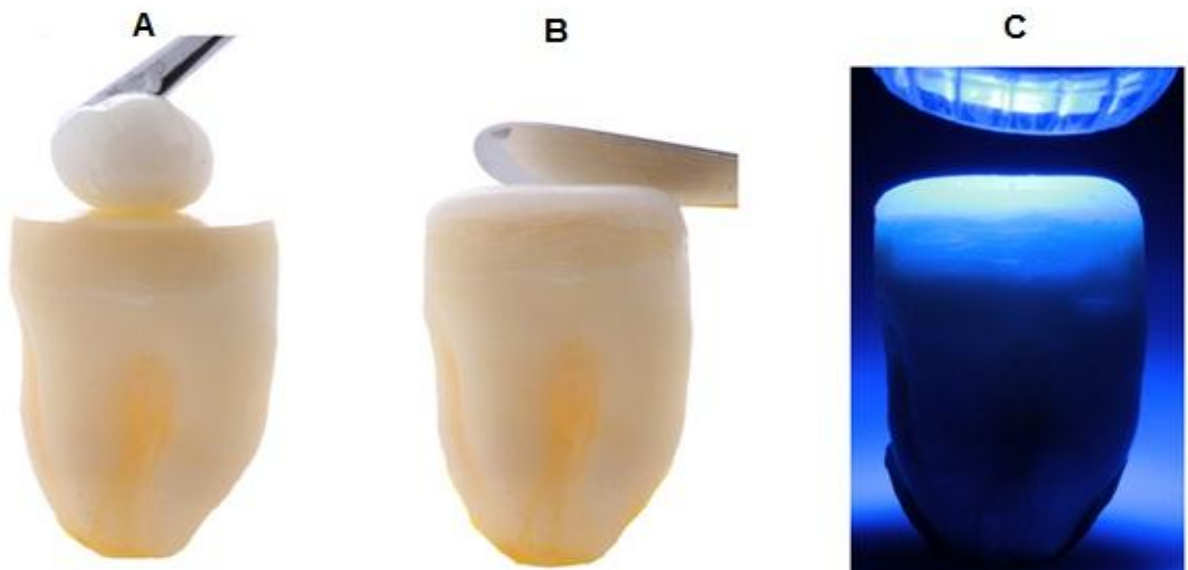


Figura 6- Confeção de restaurações de resina composta. (A) resina composta para confecção de um incremento; (B) adaptação do incremento de resina; (C) fotoativação da resina.

Após 24 horas de armazenamento em água destilada a 37°C, os dentes foram seccionados, em ambos os sentidos "x" e "y", ao nível da interface de união (Figura 7), com um disco diamantado acoplado a uma máquina de corte Isomet (Isomet 1000, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA), a 400 rpm para obter espécimes com uma área de secção transversal de aproximadamente 0,8 mm². Metade dos espécimes de cada dente foi testada em 24 horas e o restante foi testado após armazenamento de 24 meses em água destilada a 37°C (Figura 7). Para o teste de

resistência de união, cada espécime foi mensurado através de um paquímetro digital (Absolute Digimatic, Mitutoyo, Tóquio, Japão) e foram então fixados ao dispositivo de Geraldelli (Odeme Biotecnologia, Luzerna, SC, Brasil), com uma cola de cianoacrilato (Super Bonder Gel, Loctite, São Paulo, SP, Brasil) e submetidos a uma força de tração em uma máquina de ensaios universal (Kratos Dinamometros, São Paulo, SP, Brasil) a uma velocidade de 0,5 mm/min (Figura 8). Os modos de falha foram avaliados em 40X (Eclipse E200, Nikon, Tóquio, Japão) e classificados como coesiva (falha exclusivamente em dentina [CD] ou resina [CR]), adesiva (falha na interface resina/dentina [A]) e mista (falha na interface resina/dentina que incluiu falha coesiva dos substratos vizinhos [M]) (Figura 9).

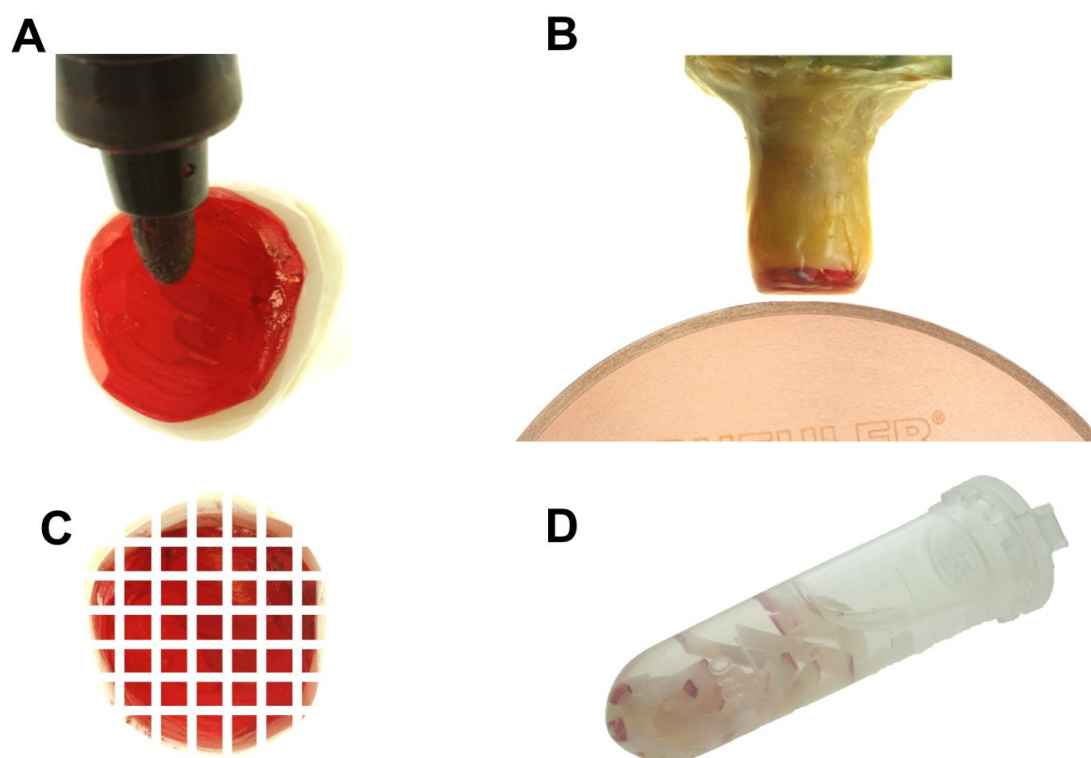


Figura 7- Sequência de corte para a obtenção dos espécimes. (A) superfície oclusal das coroas restauradas com resina composta marcadas com canetas permanentes para facilitar a visualização dos espécimes após o corte; (B) dente fixado com cera pegajosa ao dispositivo da máquina de corte, montada com um disco diamantado; (C) duas sequências perpendiculares de corte, uma no eixo x e outra no eixo y, permitiu a obtenção dos espécimes para o teste de resistência de união; (D) em *eppendorfs*, os espécimes de cada dente foram armazenados em água destilada.

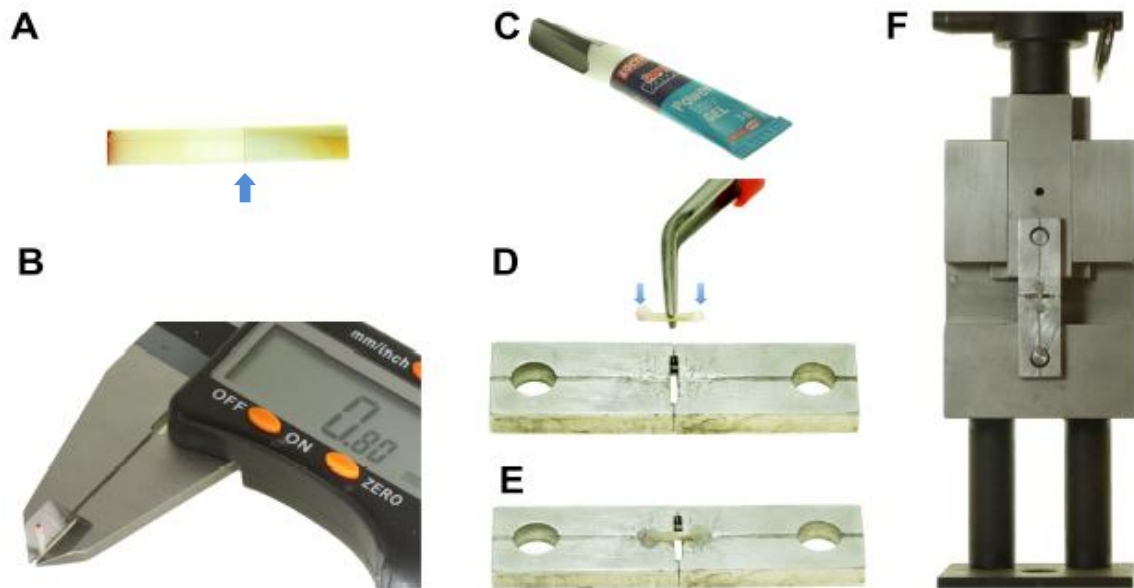


Figura 8- Sequência para o teste de microtração. (A) a seta azul indica a interface adesiva entre dentina e resina, em uma vista lateral do espécime; (B) mensuração da largura e da espessura do espécime, com paquímetro digital, para o cálculo da área da interface adesiva; (C) cola de cianocrilato em gel (que permite controle da aplicação); (D) aplicação da cola nas extremidades do espécime, protegendo a interface com a pinça; (E) posicionamento do espécime no dispositivo de Geraldelli deixando a interface adesiva no espaço central do dispositivo; (F) adaptação do dispositivo na máquina de ensaios universais após a secagem da cola.

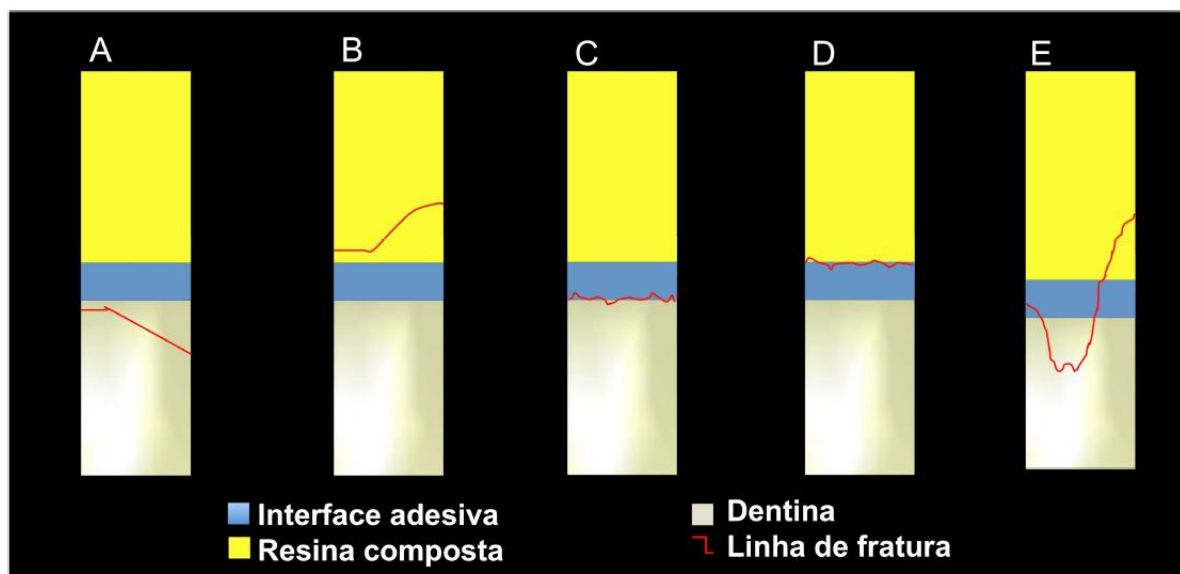


Figura 9- Tipos de fratura: (A) coesiva em dentina; (B) coesiva em resina composta; (C) adesiva na camada híbrida; (D) adesiva na camada adesiva; (E) mista.

3.4 NANOINFILTRAÇÃO (NI)

Dois espécimes de cada dente foram imersos numa solução de nitrato de prata amoniacal, 50% em peso, e armazenados em ambiente escuro durante 24 horas. As amostras foram, então, lavadas em água destilada e colocadas em solução foto-reveladora durante 8 horas sob uma luz fluorescente. Este procedimento é realizado para reduzir os íons de diamina de prata em grãos de prata metálica. Os espécimes impregnados com prata foram montados em *stubs* de alumínio e polidos, no sentido contrário à interface de união, com lixas de SiC nas granulações 1000, 1200, 1500, 2000 e 2500, sendo a seguir aplicada pastas diamantadas de granulação 1 e 0,5 μm com um feltro especial (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) [Figura 10]. As amostras foram limpas em cubas ultrassônicas com água destilada por 30 min (Dabi Atlante-3L, Ribeirão Preto, SP, Brasil), desidratadas em sílica coloidal por 24h e revestidas em ouro para leitura e análise das interfaces de união à dentina, por microscopia eletrônica de varredura [MEV] (SSX-500, Shimadzu, Tóquio, Japão), com uma tensão de aceleração de 12 kV e utilizando espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDX). A quantidade de NI dentro da camada adesiva, camada híbrida e tags de resina em cada espécime foi medida com EDX em 3 regiões (5 \times 5 μm) da amostra (esquerda, centro e direita). A percentagem relativa de nanoinfiltração dentro destas áreas foi medida em todas as imagens utilizando o software ImageTool 3.0 UTHSCSA (Department of Dental Diagnostic Ciência, University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, EUA).

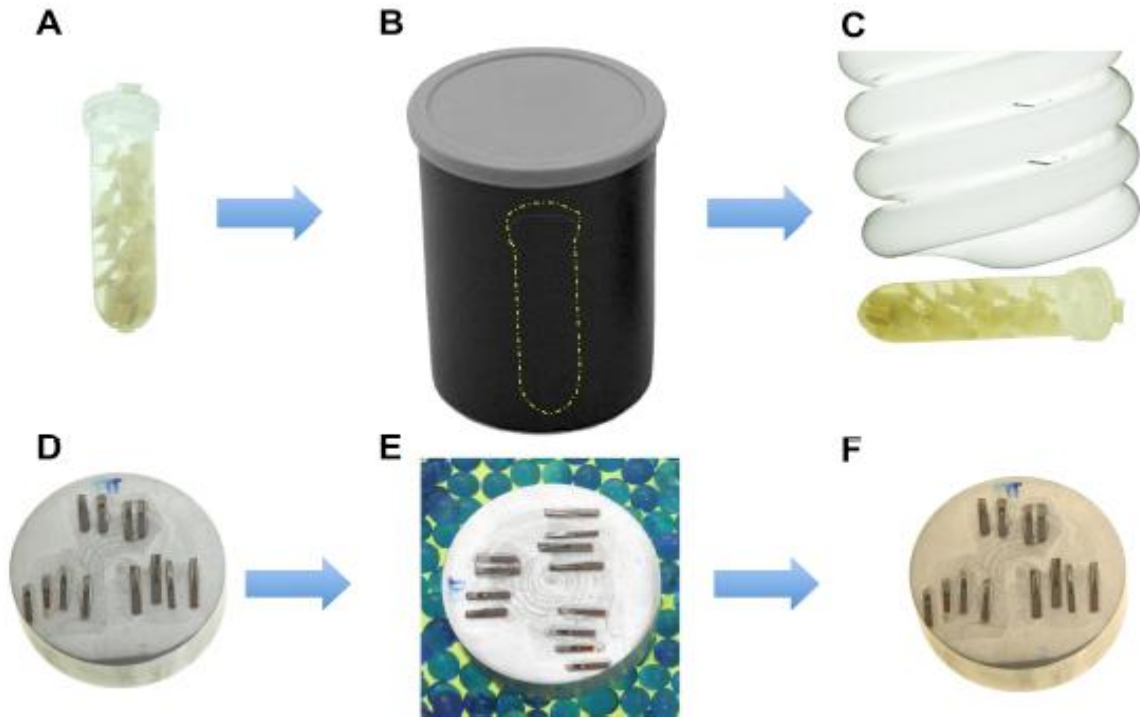


Figura 10- Preparo de amostras para NI: (A) palitos imersos em uma solução aquosa de nitrato de prata (pH=7,0); (B) armazenados por 24 h sob ambiente totalmente escuro; (C) após lavagem, espécimes foram imersos em solução reveladora por 8 h sob luz fluorescente; (D) palitos revelados, montados em *stubs* de alumínio para facilitar o polimento uniforme; (E) palitos dessecados em sílica por 24 h; (F) palitos metalizados para a análise em MEV.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para liberação de CHX (% e mg/g), os dados de cada adesivo foram submetidos a ANOVA de dois fatores, sendo eles o sistema adesivo e a concentração de diacetato de CHX utilizada. Para RU e NI, a unidade experimental no presente estudo foi o hemi-dente, uma vez que metade do dente foi testada no tempo IM e a outra metade foi testada após 24 meses de armazenamento em água. Foi realizada a média dos valores de resistência de união de todos os espécimes com falha adesiva/mista dentro de cada período de avaliação para fins estatísticos. Os espécimes com falhas coesivas e falhas prematuras não foram incluídos. Da mesma forma, uma única porcentagem de nanoinfiltração foi obtida por cada metade do dente (tempo imediato e após 24 meses). Os valores da média de RU e NI, de todos os espécimes do mesmo hemi-dente, foram calculados para fins estatísticos. Os dados de RU (MPa) e NI (%) para cada adesivo foram submetidos à análise de variância de dois fatores (ANOVA) sendo eles o tempo de armazenamento e a

concentração utilizada. O teste de Tukey foi utilizado para comparações de pares ($\alpha = 0,05$), utilizando o software Statistica for Windows (StatSoft, Tulsa, OK, EUA) para todos os testes.

Antes de submeter os dados para a análise estatística adequada, o teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar se os dados seguiram uma distribuição normal e o teste de Barlett para avaliar a igualdade de variâncias.

4 RESULTADOS

4.1 LIBERAÇÃO DE CLOREXIDINA

A curva analítica de regressão linear, entre os valores de absorvância e concentrações de CHX, apresentou um coeficiente de correlação de $r = 0,99959$, tornando-o adequado para a determinação da liberação de CHX. Foi realizada uma avaliação matemática dos perfis de liberação *in vitro* e foi selecionado o melhor modelo, considerando o coeficiente de correlação (r), o critério de seleção de modelo (CSM), o ajuste gráfico e a coerência dos valores encontrados para as constantes de velocidade para cada modelo, sendo a equação biexponencial a mais adequada para explicar os resultados experimentais (Stanislawczuk et al.⁶⁵ 2014).

Os valores de liberação de CHX nos tempos 28 dias e 2 anos estão apresentados na Tabela 3. Para ambos os adesivos, a interação entre produtos foi estatisticamente significativa ($p = 0,0001$ e $p = 0,001$, respectivamente para o percentual da concentração original e para a quantidade em mg/g). A adição de diferentes concentrações influenciou a liberação de CHX nos adesivos testados. Uma maior concentração de CHX adicionada significa uma maior liberação de CHX para ambos os adesivos. A quantidade final de CHX liberada foi proporcional à concentração inicial CHX adicionada aos adesivos. Ambar apresentou uma liberação mais lenta e gradativa enquanto que XP Bond liberou CHX mais rapidamente.

Tabela 3 – Liberação de clorexidina em % e mg/g de todas as condições experimentais após 28 dias e 2 anos de armazenamento em água.

ADESIVO	LIBERAÇÃO DE CHX				
	CONCENTRAÇÃO	28 DIAS		2 ANOS	
		% DA CONCENTRAÇÃO ORIGINAL	(mg/g)	% DA CONCENTRAÇÃO ORIGINAL	(mg/g)
XP Bond	0,01	25,0 [1,1] A	0,025 [0,013] c	2,0 [0,2] C	0,002 [0,003] a
	0,05	23,0 [1,2] A	0,115 [0,002] e	1,6 [0,4] C	0,008 [0,002] b
	0,1	24,5 [1,4] A	0,245 [0,018] f	3,0 [0,8] C	0,030 [0,018] c
	0,2	22,6 [1,5] A	0,452 [0,047] g	4,2 [0,7] C	0,083 [0,047] d
AMBAR	0,01	10,0 [0,9] B	0,010 [0,003] b	9,0 [0,7] B	0,009 [0,003] b
	0,05	10,4 [0,7] B	0,052 [0,003] d	10,6 [0,9] B	0,053 [0,004] d
	0,1	13,2 [1,1] B	0,132 [0,045] e	10,2 [0,9] B	0,103 [0,045] e
	0,2	12,0 [1,2] B	0,240 [0,048] f	10,5 [1,1] B	0,210 [0,048] f

Mesmas letras maiúsculas para CHX (%) e minúsculas para CHX (mg/g) indicam que não há diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

4.2 RESISTÊNCIA DE UNIÃO (RU)

O padrão de fratura de todos os grupos experimentais está representado na Tabela 4. Os espécimes com falhas coesivas e falhas prematuras não foram incluídos na análise estatística. As médias e desvios padrão de RU para todos os grupos estão presentes na Tabela 5. Para ambos os adesivos, a interação entre produtos foi estatisticamente significativa ($p= 0,002$ e $p= 0,001$ para AM e XP, respectivamente). Ambar apresentou valores melhores na porcentagem de redução da resistência de união após 2 anos de armazenamento em água. Ambos os adesivos apresentaram melhores valores de resistência de união nos grupos contendo CHX, quando comparados ao grupo controle (sem CHX).

Tabela 4 – Número (%) de espécimes de acordo com o padrão de fratura e falhas prematuras para cada grupo experimental. (*)

	Ambar				XP Bond			
	Imediato		2 anos		Imediato		2 anos	
	A/M	C	A/M	C	A/M	C	A/M	C
Controle (sem CHX)	34 (80,9)	8 (19)	30 (83,3)	6 (16,6)	31 (81,5)	7 (18,4)	27 (77,1)	8 (22,8)
0,01 CHX	38 (79,1)	10 (20,8)	32 (84,2)	6 (15,7)	31 (75,6)	10 (24,3)	25 (75,7)	8 (24,2)
0,05 CHX	39 (81,2)	9 (18,7)	37 (88)	5 (11,9)	34 (80,9)	8 (19)	29 (87,8)	4 (12,1)
0,1 CHX	37 (80,4)	9 (19,5)	33 (86,8)	5 (13,1)	30 (69,7)	13 (30,2)	36 (94,7)	2 (5,2)
0,2 CHX	42 (77,7)	12 (22,2)	33 (76,7)	10 (23,2)	37 (74)	13 (26)	32 (82)	7 (17,9)

(*) A/M – modo de fratura adesiva/mista; C – fratura coesiva.

Tabela 5 – Médias e desvios padrão de resistência de união (MPa) de cada grupo experimental. (*)

	AMBAR			XP BOND		
	IMEDIATO	2 ANOS	% de redução	IMEDIATO	2 ANOS	% de redução
Controle (sem CHX)	50,3 ± 4,1A	30,1 ± 4,3C	40,2	60,2 ± 3,1a	28,1 ± 3,9c	53,3
0,01 CHX	53,8 ± 4,0A	44,8 ± 2,3B	16,7	63,3 ± 4,7a	41,9 ± 3,9b	33,8
0,05 CHX	50,0 ± 4,7A	41,5 ± 4,0B	17,0	59,4 ± 4,0a, b	40,3 ± 3,9b	32,1
0,1 CHX	52,7 ± 3,5A	47,4 ± 3,4A, B	10,0	64,1 ± 4,0a	45,5 ± 3,9b	29,1
0,2 CHX	55,6 ± 3,3A	49,8 ± 3,1A	10,4	63,2 ± 3,1a	44,7 ± 3,9b	29,3

(*) As comparações são válidas apenas dentro de cada adesivo. Para cada adesivo, a mesma letra minúscula ou maiúscula indicam médias estatisticamente diferentes (teste de Tukey, $p > 0,05$).

4.3 NANOINFILTRAÇÃO (NI)

As médias e desvios padrão de NI são mostradas na Tabela 6. Os grupos controle apresentaram uma maior nanoinfiltração no período 2 anos, o que indica uma maior degradação da interface de união à dentina. Os grupos controle de ambos o adesivos apresentaram maior nanoinfiltração que os grupos que continham clorexidina na sua composição. As imagens de MEV estão representadas na Figura 11.

A Figura 11 mostra pouca nanoinfiltração nos períodos imediatos, que ocorreram principalmente na base da camada híbrida. Depois de 2 anos, todos os grupos mostraram nanoinfiltração mais perceptível, que ocorreu quase por toda a espessura da camada híbrida, e foi mais pronunciada nos grupos controle. Nenhuma condição experimental apresentou ausência de nanoinfiltração.

Tabela 6 – Médias e desvios padrão de nanoinfiltração (%) para todos os grupos experimentais. (*)

	Ambar		XP Bond	
	Imediato	2 anos	Imediato	2 anos
Controle (sem CHX)	16,3 ± 4,5 A	24,3 ± 3,1 C	24,4 ± 3,6 a	44,1 ± 4,3 c
0,01 CHX	12,5 ± 3,8 A	22,3 ± 3,6 B, C	26,5 ± 3,9 a	36,5 ± 4,7 b
0,05 CHX	14,5 ± 4,1 A	21,3 ± 2,6 B, C	27,4 ± 4,6 a	39,7 ± 4,9 b, c
0,1 CHX	13,6 ± 4,4 A	17,2 ± 3,3 B	24,5 ± 4,1 a	33,5 ± 3,8 b
0,2 CHX	14,3 ± 3,9 A	18,4 ± 4,3 B	26,1 ± 3,3 a	34,5 ± 4,7 b

(*) As comparações são válidas apenas dentro de cada adesivo. Para cada adesivo, a mesma letra minúscula ou maiúscula indicam médias estatisticamente diferentes (teste de Tukey, $p > 0,05$).

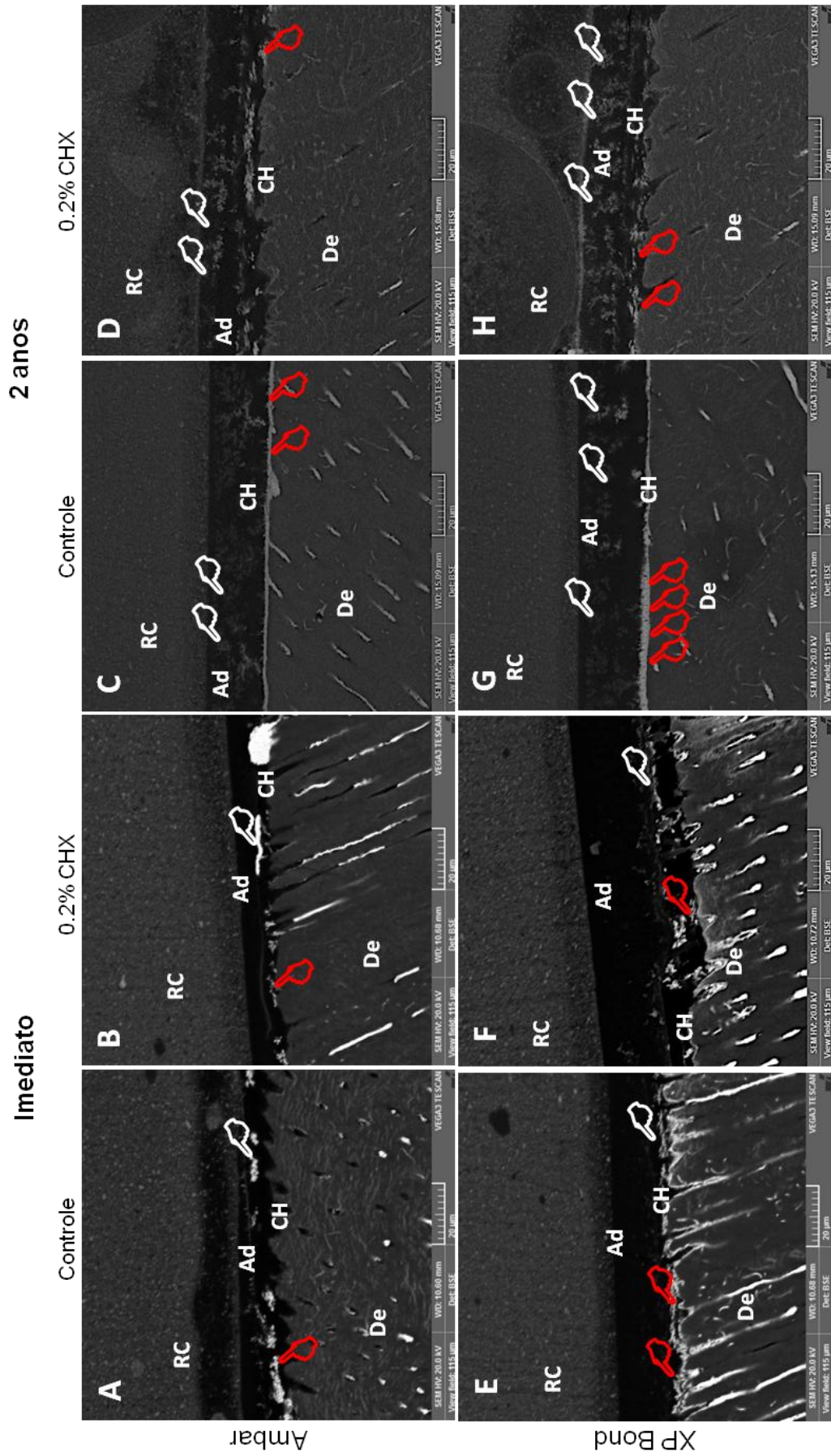


Figura 11 – Imagens de MEV das interfaces adesivas. Os depósitos de nitrato de prata encontram-se principalmente dentro da camada híbrida. No entanto, após 2 anos de armazenamento em água, este depósito foi mais acentuado nos grupos controle (C e G), quando comparado aos grupos contendo CHX (D e H). (RC= resina composta; Ad= camada adesiva; CH= camada híbrida; De= dentina).

5 DISCUSSÃO

A dentina é desmineralizada pela ação do ácido fosfórico, expondo uma densa camada de fibrilas da matriz orgânica (Marshall et al.⁷⁸ 1997) de colágeno que deverá ser totalmente infiltrada pelo sistema adesivo para formar a camada híbrida (Toledano et al.⁷⁹ 2002; Breschi et al.⁸⁰ 2003). Porém, uma diminuição no gradiente de difusão dos monômeros resinosos resulta em uma camada de desmineralização da matriz de colágeno na base da camada híbrida não preenchida por monômeros (Marshall et al.⁷⁸ 1997; Van Meerbeek et al.⁸¹ 2000; Osorio et al.⁸² 2002; Breschi et al.⁸⁰ 2003). A redução da resistência mecânica da interface de união é acompanhada por alterações morfológicas provenientes da desnaturação parcial ou completa de seus constituintes, isto é, das resinas compostas, dos sistemas adesivos e da dentina modificada pelo procedimento adesivo. (Breschi et al.⁴⁶ 2010).

Recentemente, alguns estudos têm demonstrado que as MMPs da dentina podem ser responsáveis pela degradação do colágeno exposto pelo condicionamento ácido e não preenchido pelo sistema adesivo, uma vez que as MMPs são ativadas pelo baixo pH gerado pelo ácido fosfórico ou pelo monômeros resinosos, sendo responsáveis pela quebra da tripla hélice da fibrila colágena e sua posterior degradação (Breschi et al.⁸³ 2004; Pashley et al.²⁷ 2004; Bracket et al.²⁸ 2007).

A clorexidina quando aplicada sobre as fibrilas colágenas expostas e, em seguida, selada com o adesivo resinoso, pode proteger o colágeno contra ataques colagenolíticos, retardando assim uma das vias de degradação dos adesivos (Hebling et al.¹⁰ 2005; Carrilho et al.⁷ 2007; Carrilho et al.²⁹ 2007). Quando em baixas concentrações, a clorexidina pode inibir os efeitos das MMPs através de mecanismos quelantes dos cátions, onde ela previne a ligação dos íons metálicos, como cálcio e zinco, com as MMPs, impedindo sua ativação catalítica, uma vez que as MMPs requerem estes íons para a sua atividade. (Gendron et al.⁷⁶ 1999; Sorsa et al.³⁹ 2006; Hannas et al.¹⁶ 2007; De Munck et al.⁶⁷ 2009). É provável que em altas concentrações de CHX, a MMP é inativada por desnaturação da proteína, em vez de pela quelação de cátions. Portanto, o efeito inibitório da clorexidina sobre as MMPs parece ser dose-dependente (Gendron et al.⁷⁶ 1999).

Enquanto alguns estudos têm incorporado digluconato de CHX (Zhou et al.⁶⁶ 2009; Zhou et al.⁷⁴ 2010), outros têm adicionado diacetato de CHX (De Munck et

al.⁶⁷ 2009; De Munck et al.⁷¹ 2010). A principal diferença é que digluconato de CHX só está disponível como uma solução aquosa e diacetato de CHX está disponível como um pó. A adição de digluconato de clorexidina em um adesivo também significa a adição de água para a formulação, o que pode prejudicar o desempenho do adesivo devido ao aprisionamento de água (Jacobsen et al.⁸⁵ 1995; Dickens et al.⁸⁶ 2005). Portanto, neste estudo, incluímos diacetato de CHX ao invés de digluconato.

As MMPs são enzimas que requerem água para hidrolisarem ligações peptídicas com as moléculas colágenas (Pashley et al.²⁷ 2004). Para garantir a integridade dos componentes resinosos da camada híbrida, a menor permeabilidade dos adesivos hidrofóbicos tem um efeito adicional na durabilidade da interface adesiva, evitando absorção de água dentro da matriz dentinária, limitando assim a degradação do colágeno pelas MMPs (Carrilho et al.¹³ 2005; Komori et al.⁸⁴ 2009).

Diversos estudos demonstraram que a aplicação de um *primer* contendo CHX após o condicionamento ácido e previamente a aplicação de sistemas adesivos demonstrou aumento da longevidade de união à dentina (Hebling et al.¹⁰ 2005; Carrilho et al.²⁹ 2007). Entretanto, existe a necessidade de simplificação do protocolo clínico, tal como através da inclusão de CHX em um ácido fosfórico (Stanislawczuk et al.⁶⁸ 2009; Stanislawczuk et al.⁶⁹ 2011). Seguindo a mesma proposta, incluiu-se CHX em sistemas adesivos, contudo, os dados de longevidade de união à dentina são controversos (Zhou et al.⁶⁶ 2009; Zhou et al.⁷⁴ 2010; De Munck et al.⁶⁷ 2009; De Munck et al.⁷¹ 2010). Isto se deve principalmente ao tipo de adesivo utilizado, mas também à concentração de CHX adicionada.

Quando concentrações muito altas, tais como 1-5% de CHX são adicionadas a adesivos, ocorre significativo aumento da solubilidade (Hiraishi et al.⁷³ 2008) e diminuição do módulo de elasticidade e grau de conversão do polímero formado (Cadenaro et al.⁷⁵ 2009). Sendo assim, é fundamental testar a influência de diferentes concentrações de CHX em várias propriedades adesivas, como por exemplo, nesse estudo, a resistência de união e a nanoinfiltração.

Nesse estudo, a adição ou não de clorexidina em diferentes concentrações nos sistemas adesivos de escolha, não influenciou nas propriedades de resistência de união e nanoinfiltração. Isto significa que a adição de CHX não mudou o padrão de união destes adesivos. Pode-se observar que, para os dois sistemas adesivos

testados, ocorreu um significativo aumento da resistência de união quando a CHX foi adicionada, independente da concentração de CHX utilizada.

Diferentemente da aplicação como *primer* ou dentro da composição do ácido, a liberação dentro de um adesivo, especialmente depois de ocorrer a polimerização, é muito mais complicada, já que a CHX está dentro da reticulação formada pelo polímero. Contudo, ocorreu significativa liberação de CHX dentro dos tempos determinados por esse estudo em contato com a água, ou seja, cerca 23% da CHX incorporada no adesivo XP no período 28 dias e 2,7% no período 2 anos, e de 11,4% no período 28 dias e 10% no período 2 anos para a incorporação no adesivo AM.

Esta presença de CHX sendo liberada por um longo período de tempo pode ser responsável pela diminuição da degradação observada, já que concentrações tão pequenas quanto 0,002% resultam na inibição completa da atividade da MMP-9, enquanto que a atividade da MMP-2 pode ser inibida por uma concentração de CHX tão baixa quanto 0,0001% e concentrações de CHX entre 0,01% e 0,02% são suficientes para inibir completamente as atividades de MMP-8 (Gendron et al.⁷⁶ 1999), e assim também diminuir a degradação ao longo do tempo (Loguercio et al.⁸⁷ 2009).

Como mencionado por Hiraishi e colaboradores⁷³, os adesivos com CHX interagem quando em contato com um ambiente externo, de modo que, após um período de tempo, a concentração de CHX liberada pode já não ser suficiente para exercer qualquer inibição apreciável. No entanto, os adesivos que estão em contato com a dentina por embricamento mecânico com a mesma, através da camada híbrida, faz com que a CHX fique “aprisionada” e tenha a tendência de permanecer nos espaços interfibrilares devido à substantividade da CHX em dentina mineralizada e desmineralizada (Carrilho et al.⁷⁷ 2010).

Apesar do efeito da CHX ter sido semelhante entre os sistemas adesivos de escolha, o adesivo XP apresentou uma degradação maior quando comparado ao sistema adesivo AM (Tabelas 5 e 6). Isto pode ser explicado por um estudo realizado por Stanislawczuk e colaboradores⁶⁵, onde o adesivo XP demonstrou maior quantidade de sorção e de solubilidade e, conseqüentemente, liberou a CHX inclusa em sua formulação mais rapidamente. Hiraishi e colaboradores⁷³ demonstraram que a liberação de CHX em sistemas adesivos é diretamente proporcional à sorção de

água que ocorre dentro do material, indicando que o sistema adesivo XP deve ser mais hidrófilo do que AM.

Seria ideal se a CHX adicionada aos sistemas adesivos fosse liberada em quantidades suficientes para preservar a união à dentina ao longo do tempo, sem alterar as propriedades mecânicas do polímero em contato com a estrutura dentária. Os resultados deste trabalho fornecem base para a comprovação de que a adição da CHX em concentrações de até 0,2% em sistemas adesivos convencionais é um meio viável para proporcionar a liberação controlada de CHX em concentrações suficientes para que ocorra a inibição da atividade das MMPs ao longo do tempo. No entanto, devido a diferentes composições dos sistemas adesivos disponíveis no mercado, esta adição deve ser avaliada conforme a formulação química variada desses sistemas para que se obtenha o efeito desejado sobre a estabilidade das moléculas de CHX.

6 CONCLUSÃO

Dentro das limitações do presente estudo, concluiu-se que a adição de diacetato de CHX, principalmente nas concentrações 0,1 e 0,2 %, para os adesivos convencionais comerciais é viável, já que diminuiu a degradação após 2 anos de armazenamento em água, sendo que este resultado deve ser atribuído à liberação de CHX controlada em concentração suficiente para que ocorra a diminuição da degradação da interface dentina-resina.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, Van Landuyt K, Lambrechts P, Vanherle G. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent* 2003; 28: 215-35.
- 2- Carvalho RM, Carrilho MRO, Pereira LCG, Garcia FCP, Marquezini L, Kussmaul APM. Sistemas adesivos: fundamentos para a compreensão de sua aplicação clínica. *Biodonto* 2004; 2: 1-85.
- 3- Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano. Dental Adhesion review: aging and stability of bonded interface. *Dent Mater* 2007; 24: 90-101.
- 4- Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, Donnelly A, Garcia-Godoy F. From dry bonding to water wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *Am J Dent* 2007; 20: 7-20.
- 5- Carvalho RM. Adesivos dentinários. Fundamentos para aplicação clínica. *Rev Dent Rest.* 1998; 1: 62-96.
- 6- Peumans, Kanumilli P, De Munck J, Van Landuyt K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Clinical effectiveness of contemporary adhesives: A systematic review of current clinical trials. *Dent Mater* 2005; 21: 864-81.
- 7- Carrilho MRO, Geraldeli S, Tay FR, de Goes MF, Carvalho RM, Tjärderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breaschi L, Pashley DH. In vivo preservation on hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res* 2007; 86: 529-33.
- 8- Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res* 2000; 79: 1385-91.
- 9- Hashimoto M, Tay FR, Ito S, Sano H, Kaga M, Pashley DH. Permeability of adhesives resin interfaces after long-term function. *Am J Dent* 2001; 14: 211-5.
- 10- Hebling J, Pashley DH, Tjärderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers *in vivo*. *J Dent Res* 2005; 84: 741-6.
- 11- Donmez N, Belli S, Pashley DH, Tay FR. Ultrastructural correlates of in vivo/in vitro bond degradation in self-etch adhesives. *J Dent Res* 2005; 84: 355-9.

- 12- Sano H, Yoshikawa T, Pereira PN, Kanemura N, Morigami M, Tagami J, et al. Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, in vivo. *J Dent Res* 1999; 78: 906-11.
- 13- Carrilho MRO, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Durability of resin-dentin bonds related to water and oil storage. *Am J Dent* 2005; 18: 315-9.
- 14- De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, Lambrechts P, Vanherle G. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res* 2003; 82: 136-40.
- 15- Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res* 2006; 85: 22-32.
- 16- Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjärderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand* 2007; 65: 1-13.
- 17- Sano H. Microtensile testing, nanoleakage, and biodegradation of resin-dentin bonds. *J Dent Res* 2006; 85: 11-14.
- 18- Sano H, , Takatsu T, Ciucchi B, Horner JA, Matthews WG, Pashley DH. Nanoleakage: leakage within the hybrid layer. *Oper Dent* 1995; 20: 18-25.
- 19- Sano H, Yoshiyama M, Ebisu S, Burrow MF, Takatsu T, Ciucchi B, Carvalho R, Pashley DH. Comparative SEM and TEM observations of nanoleakage with-in the hybrid layer. *Oper Dent* 1995; 20: 160-7.
- 20- Wang Y, Spencer P. Quantifying adhesive penetration in adhesive/dentin interface using confocal Raman microspectroscopy. *J Biomed Mat Res* 2002; 59: 46-55.
- 21- Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater* 2006; 22: 211-22.
- 22- Santerre JP, SHAJII L, LEUNG BW. Relation of dental composite formulations to their degradation and release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit Rev in Oral Biol Med* 2001; 12: 136-51.
- 23- Tay FR, Pashley DH, Yoshiyama, M. Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives. *J Dent Res* 2002; 81: 472-6.
- 24- Van Meerbeek B. The “myth” of nanoleakage. *J Adhes Dent* 2007; 9: 491-2.
- 25- Nakabayashi N, Saimi Y. Bonding to intact dentin. *J Dent Res* 1996; 75: 1706-15.

26- Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res* 1998; 77: 1622-9.

27- Pashley DH, , Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004; 83: 216-21.

28- Brackett WW, Tay FR, Brackett MG, Dib A, Sword RJ, Pashley DH. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo. *Oper Dent* 2007; 32: 107-11.

29- Carrilho MRO, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res* 2007; 86: 90-4.

30- Zhang SC, Kern M. The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. *Intern J Oral Scie* 2009; 1: 163-76.

31- Moon PC, Weaver J, Brooks CN. Review of matrix metalloproteinases effect on the hybrid dentin bond layer stability and chlorhexidine clinical use to prevent bond failure. *The Open Dent J* 2010; 20: 147-52.

32- Wang Y, Spencer P. Hybridization, efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res* 2003; 82: 141-5.

33- Wang Y, Spencer P. Physiochemical interactions at the interfaces between self-etch adhesive systems and dentine. *J Dent* 2004; 32: 567-79.

34- Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, Toledano M, Pashley DH, Tay FR. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentin by etch-and-rinse adhesives. *Biomat* 2006; 27: 4470-6.

35- Brackett MG, Tay FR, Brackett WW, Dib A, Dipp FA, Mai S, Pashley DH. In vivo chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive. *Op Dent* 2009; 34: 379-83.

36- Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, De Carlo A, Engler JA. Matrix Metalloproteinases: A Review. *Crit Rev in Oral and Med* 1993; 4: 197-250.

37- Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 1362-78.

- 38- Perdigão J, Reis A, Loguercio A. Dentin Adhesion and MMPs: A Comprehensive Review. *J Esthet and Rest Dent*. 2016; 25: 219-41.
- 39- Sorsa T, Tjaderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med* 2006; 38: 306-21.
- 40- Hashimoto M, Tay FR, Ohno H, Sano H, Kaga M, Yiu C, Kumagai H, Kudou Y, Kubota M, Oguchi H. SEM and TEM analysis of water degradation of human dentinal collagen. *J Biomed Mater Res Part B:Appl Biomater* 2003; 66B: 287-98.
- 41- Carvalho RM, Chersoni S, Frankenberger R, Pashley DH, Prati C, Tay FR. A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives. *Biomater*. 2005; 26: 1035-42.
- 42- Armstrong SR, Jessop JLP, Vargas MA, Zou Y, Qian F, Campbell JA, Pashley DH. Effects of exogenous collagenase and cholesterol esterase on the durability of the resin-dentin bond. *J Adhes Dent* 2006; 8: 151-60.
- 43- Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breaschi L, Mannello F, Mazzoni A, Carvalho RM, Tjäderhane L, Tay FR, Pashley DH. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci* 2006; 114: 160-6.
- 44- Du X, Huang X, Huang C, Wang Y, Zhang Y. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) enhances the therapeutic activity of a dental adhesive. *J Dent*. 2012; 40: 485-92.
- 45- Yun JH, Pang EK, Kim CS, Yoo YJ, Cho KS, Chai JK, et al. Inhibitory effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate on the expression of matrix metalloproteinase-9 and on the formation of osteoclasts. *J Periodont Res*. 2004; 39: 300-7.
- 46- Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjaderhane L, et al. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dent Mat*. 2010; 26: 571-8.
- 47- Stanislawczuk R, Costa JA, Polli LG, Reis A, Loguercio AD. Effect of tetracycline on the bond performance of etch-and-rinse adhesives to dentin. *Braz Oral Res*. 2011; 25: 459-65.
- 48- C Sabatini JH Kim P Ortiz Alias In Vitro Evaluation of Benzalkonium Chloride in the Preservation of Adhesive Interfaces. *Oper Dent*. 2014; 39: 283-90.

49- Donmez N, Belli S, Pashley DH, Tay FR. Ultrastructural Correlates of in vivo/in vitro Bond Degradation in Self-etch Adhesives. *J Dent Res.* 2005; 84: 355-9.

50- Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Uchiyama T, Imazato S, Mutluay MM, Cadenaro M, et al. The inhibitory effects of quaternary ammonium methacrylates on soluble and matrix-bound MMPs. *J Dent Res.* 2011; 90: 535-40.

51- Jacques P, Hebling J. Effect of dentin conditioners on the microtensile bond strength of a conventional and a self-etching primer adhesive system. *Dent Mater* 2005; 21: 103-9.

52- Sauro S, Mannocci F, Toledano M, Osorio R, Pashley DH, Watson TF. EDTA or H3PO4/NaOCl dentine treatments may increase hybrid layers' resistance to degradation: a microtensile bond strength and confocal-micropermeability study. *J Dent.* 2009; 37: 279-88.

53- Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen Degradation by Host-derived Enzymes during Aging. *J Dent Res.* 2004; 83: 216-21.

54- Denton GW. Chlorhexidine. Disinfection, Sterilization and Preservation. 4th ed Philadelphia, PA Editora Block SS. 1991: 274–89.

55- Davies A. The mode of action of chlorhexidine. *J Periodont Res.* 1973; 8: 68-75.

56- Brex M, Theilade J. Effect of chlorhexidine rinses on the morphology of early dental plaque formed on plastic films. *J Clin Periodontol* 1984; 11: 553–64.

57- Boobis. Londres Dollery: Chlorhexidine. *Therapeutics Drugs.* 1991; 2: 181-3.

58- Zanatto ARL. Efeitos de bochechos de clorexidina na saúde gengival em pacientes portadores de aparelhos ortodônticos. *Periodontia.* 1996; 5: 309.

59- Brauner MT. Controle Químico da Placa. Estudo Comparativo e entre a Clorexidina e a Alexidina. *Revista APCD.* 1982; 36: 594-604.

60- Navarro MFL, Côrtes DF. Avaliação e Tratamento do Paciente com Relação ao Risco de Cárie. *Maxi-Odonto: Dentística.* 1995; 1: 1-38.

61- Denardi BB. O uso de clorexidina na prática odontológica. *Revista APCD.* 1994; 48: 1279- 84.

62- Palmer G, Jonesa F H, Billingtonb R W, Pearson G J. Chlorhexidine release from an experimental glass ionomer cement. *Biomat* 2004; 25: 5423–5431.

- 63- Leung D, Spratt D A, Pratten J, Gulabivala K, Mordan N J, Young A M. Chlorhexidine-releasing methacrylate dental composite materials. *Biomater* 2005; 26: 7145–53.
- 64- Stanislawczuk R, Pereira F, Muñoz MA, Luque I, Farago PV, Reis A, Loguercio AD. Effects of chlorhexidine-containing adhesives on the durability of resin-dentine interfaces. *J Dent*. 2014; 1: 39-47.
- 65- Stanislawczuk R, Reis A, Malaquias P, Pereira F, Farago PV, Meier MM, Loguercio AD. Mechanical properties and modeling of drug release from chlorhexidine-containing etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*. 2014; 30: 392-9.
- 66- Zhou J, Tan J, Chen L, Li D, Tan Y. The incorporation of chlorhexidine in a two-step self-etching adhesive preserves dentin bond in vitro. *J Dent*. 2009; 37: 807-12.
- 67- De Munck J, Van den Steen PE, Mine A, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G. Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces. *J Dent Res*. 2009; 88: 1101-6.
- 68- Stanislawczuk R, Amaral RC, Zander-Grande C, Gagler , Reis A, Loguercio AD. Chlorhexidine-containing acid conditioner preserves longevity of resin-dentin bonds. *Oper Dent*. 2009; 34: 481-90.
- 69- Stanislawczuk R, Reis A, Loguercio AD. A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin-dentin interfaces. *J Dent*. 2011; 39: 40-7.
- 70- Zhou J, Tan J, Yang X, Xu X, Li D, Chen L. MMP-inhibitory effect of chlorhexidine applied in a self-etching adhesive. *J Adhes Dent*. 2011; 13: 111–5.
- 71- De Munck J, Mine A, Van den Steen PE, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G. Enzymatic degradation of adhesive–dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives. *Eur J Oral Scienc*. 2010; 118: 494–501.
- 72- Paul SJ, Leach M, Rueggeberg FA, Pashley DH. Effect of water content on the physical properties of model dentine primer and bonding resins. *J Dent*. 1999; 27: 209–14.
- 73- Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tay FR, Pashley DH. Chlorhexidine release and water sorption characteristics of chlorhexidine-incorporated hydrophobic/hydrophilic resins. *Dent Mater* 2008; 24: 1391–9.

74- Zhou J, Tan J, Yang X, Cheng C, Wang X, Chen L. Effect of chlorhexidine application in a self-etching adhesive on the immediate resin-dentin bond strength. *J Adhes Dent*. 2010; 12: 27-31.

75- Cadenaro M, Pashley DH, Marchesi G, Carrilho M, Antonioli F, Mazzoni A, Tay FR, Di Lenarda R, Breschi L. Influence of chlorhexidine on the degree of conversion and E-modulus of experimental adhesive blends. *Dent Mater* 2009; 25: 1269-74.

76- Gendron R, Greiner D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8 and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6: 437-9.

77- Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, Nicolau J, Breschi L, Mazzoni A. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dent Mater* 2010; 26: 779-85.

78- Marshall GW Jr, Inai N, Wu-Magidi IC, Balooch M, Kinney JH, Tagami J, Marshall SJ. Dentin demineralization: Effects of dentin depth, pH and different acids. *Dent Mater* 1997; 13: 338-43.

79- Toledano M, Perdigao J, Osorio R. Influence of NaOCl deproteinization on shear bond strength in function of dentin depth. *Amer J Dent* 2002; 15: 252-5.

80- Breschi L, Perdigao J, Gobbi P, Mazzoti G, Falconi M, Lopes M. Immunocytochemical identification of type I collagen in acid-etched dentin. *J Biomed Mater Res* 2003; 66: 764-9.

81- Van Meerbeek B, Vargas M, Inoue S, Yoshida Y, Perdigao J, Lambrechts P, Vanherle G. Microscopy investigations. Techniques, results, limitations. *Am J Dent* 2000; 13: 3D-18D.

82- Osorio R, Ceballos L, Tay F, Cabrerizo-Vilchez MA, Toledano M. Effect of sodium hypochlorite on dentin bonding with a polyalkenoic acid-containing adhesive system. *J Biomed Mater Res* 2002; 60: 316-24.

83- Breschi L, Prati C, Gobbi P, Pashley D, Mazzoti G, Teti G, Perdigão J. Immunohistochemical analysis of collagen fibrils within the hybrid layer: a FEISEM study. *Oper Dent* 2004; 29: 538-46.

84- Komori PCP, Pashley DH, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, De Goes MF, Wang L, Carrilho MR. Effect of 2% chlorhexidine digluconate on the bond strength to normal versus caries-affected dentin. *Oper Dent* 2009; 34: 157-165.

85- Jacobsen T, Soderholm KJ. Some effects of water on dentin bonding. *Dent Mater* 1995; 11: 132-6.

86- Dickens SH, Cho BH. Interpretation of bond failure through conversion and residual solvent measurements and Weibull analyses of flexural and microtensile bond strengths of bonding agents. *Dent Mater* 2005; 21: 354–64.

87- Loguercio AD, Stanislawczuk R, Polli LG, Costa JA, Michel MD, Reis A. Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin-dentin bond strength durability. *Eur J Oral Sci* 2009; 117(5): 587-96.